

English Abstract for JP 7-504808

CDR-grafted humanised chimeric T cell antibodies - inhibit T cell proliferation, for treating T-cell mediated diseases e.g. graft-versus-host disease, auto-immune-diseases etc.

Patent Assignee: UNIV CAMBRIDGE TECH SERVICES LTD (UYCA-N); WALDMANN H (WALD-I); WALSH L (WALS-I); WELLCOME FOUND LTD (WELL); CROWE J S (CROW-I); LEWIS A P (LEWI-I)

Inventor: CROWE J S; LEWIS A P; WALDMANN H; WALSH L

Number of Countries: 019 Number of Patents: 008

Patent Family:

Patent No	Kind	Date	Applicat No	Kind	Date	Week
WO 9311237	A1	19930610	WO 92GB2251	A	19921204	199324 B
JP 7504808	W	19950601	WO 92GB2251	A	19921204	199530
			JP 93509972	A	19921204	
EP 667902	A1	19950823	EP 92924782	A	19921204	199538
			WO 92GB2251	A	19921204	
US 5502167	A	19960326	WO 92GB2251	A	19921204	199618
			US 94244626	A	19940715	
JP 3339637	B2	20021028	WO 92GB2251	A	19921204	200278
			JP 93509972	A	19921204	
EP 667902	B1	20030319	EP 92924782	A	19921204	200325
			WO 92GB2251	A	19921204	
DE 69232968	E	20030424	DE 632968	A	19921204	200335
			EP 92924782	A	19921204	
			WO 92GB2251	A	19921204	
ES 2194011	T3	20031116	EP 92924782	A	19921204	200381

Abstract (Basic): WO 9311237 A

A humanised antibody has an amino acid sequence of the CDRs derived from the sequence of the CDRs of a monoclonal antibody (Mab) having the specificity of binding to resting and activated T-cells, inhibiting T-cell proliferation and lysing T-cells from mice transgenic for human CD2 and in which sufficient of the amino acid sequence of each CDR has been retained to provide the same specificity for the humanised antibody.

Also claimed are a humanised antibody in which sufficient of the amino acid sequence of each CDR shown below is provided such that the antibody is capable of binding to a human T-cell antigen: light chain CDR1 (seq. ID3 and 4), CDR2 (seq. ID5 and 6), CDR3 (seq. ID7 and 8), heavy chain CDR1 (seq. ID 11 and 12), CDR2 (seq. ID 13 and 14), CDR3 (seq. ID 15 and 16), a DNA sequence encoding the light chain or the heavy chain of a humanised antibody, an expression vector which incorporates DNA sequence above; and a host transformed with the expression vector.

The humanised antibodies are prepd. by expression of DNA encoding the heavy and light chains in a host. The CDRs are pref. derived from the rat IgG26 anti-human T-cell monoclonal antibody YTH 655(5)6.

USE - The humanised antibodies can be used for the treatment or prophylaxis of T-cell mediated diseases such as graft versus host disease, transplant rejection and autoimmune diseases such as Type I diabetes, multiple sclerosis, rhematoid arthritis, systemic lupus erythematosus and myasthenia gravis. They can also be used to prepare immunotoxins. They can also be used for T-cell typing, for isolating specific YTH655 antigen bearing cells or fragments of the receptor and for vaccine prepn



PCT

WORLD INTELLECTUAL PROPERTY ORGANIZATION
International Bureau

INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(51) International Patent Classification 5 : C12N 15/13, 15/62, C12P 21/08 A61K 39/395, C12N 5/10 C07K 15/28	A1	(11) International Publication Number: WO 93/11237 (43) International Publication Date: 10 June 1993 (10.06.93)
(21) International Application Number: PCT/GB92/02251 (22) International Filing Date: 4 December 1992 (04.12.92) (30) Priority data: 9125979.6 6 December 1991 (06.12.91) GB (71) Applicant (for all designated States except US): THE WELL-COME FOUNDATION LIMITED [GB/GB]; Unicorn House, 160 Euston Road, London NW1 2BP (GB). (71)(72) Applicants and Inventors: WALDMANN, Herman [GB/GB]; WALSH, Louise [GB/GB]; Cambridge University, Department of Pathology, Immunology Division, Tennis Court Road, Cambridge CB2 1QP (GB).		(72) Inventors; and (75) Inventors/Applicants (for US only) : CROWE, James, Scott [GB/GB]; LEWIS, Alan, Peter [GB/GB]; Wellcome Research Laboratories, Langley Court, Beckenham, Kent BR3 3BS (GB). (74) Agent: MARCHANT, James, Ian; Elkington and Fife, Prospect House, 8 Pembroke Road, Sevenoaks, Kent TN13 1XR (GB). (81) Designated States: JP, US, European patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Published <i>With international search report.</i>
(54) Title: CDR GRAFTED HUMANISED CHIMERIC T-CELL ANTIBODIES (57) Abstract A humanised antibody is provided in which the amino acid sequence of the CDRs is derived from the sequence of the CDRs of a monoclonal antibody having the specificity of binding to resting and activated T-cells, inhibiting T-cell proliferation and lysing T-cells from mice transgenic for human CD2 and in which sufficient of the amino acid sequence of each CDR has been retained to provide the same specificity for the humanised antibody.		

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表平7-504808

第1部門第1区分

(43) 公表日 平成7年(1995)6月1日

(51) Int.Cl.⁶

識別記号

庁内整理番号

F I

C 1 2 P 21/08

9161-4B

A 6 1 K 39/395

A B C

9284-4C

C 0 7 K 16/18

8318-4H

9281-4B

C 1 2 N 15/ 00

Z N A A

7729-4B

5/ 00

B

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 16 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平5-509972
 (86) (22) 出願日 平成4年(1992)12月4日
 (85) 翻訳文提出日 平成6年(1994)6月6日
 (86) 国際出願番号 P C T / G B 9 2 / 0 2 2 5 1
 (87) 国際公開番号 W O 9 3 / 1 1 2 3 7
 (87) 国際公開日 平成5年(1993)6月10日
 (31) 優先権主張番号 9 1 2 5 9 7 9 , 6
 (32) 優先日 1991年12月6日
 (33) 優先権主張国 イギリス (GB)
 (81) 指定国 E P (A T , B E , C H , D E ,
 D K , E S , F R , G B , G R , I E , I T , L U , M
 C , N L , P T , S E) , J P , U S

(71) 出願人 ザ・ウエルカム・ファウンデーション・リ
 ミテッド
 イギリス国、エヌダブリュ1・2ビービ
 ー、ロンドン、ユーストン・ロード 160、
 ユニコーン・ハウス
 (71) 出願人 ワルドマン、ハーマン
 イギリス国、シービー2・1キュービー、
 ケンブリッジ、テニス・コート・ロード
 (番地無し)、イムノロジー・ディビジョ
 ン、デパートメント・オブ・パソロジー、
 ケンブリッジ・ユニバーシティ
 (74) 代理人 弁理士 鈴江 武彦 (外3名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 CDRをグラフトしたヒト化キメラT細胞抗体

(57) 【要約】

ヒト化抗体が開示される。このヒト化抗体は、ヒト
 C D 2を導入されたトランスジェニックマウス由来の休
 止T細胞および活性化T細胞に結合し、該T細胞の増殖
 を阻害し、且つ該細胞を溶解するような特異性を有する
 モノクローナル抗体のCDR配列に由来したCDRアミ
 ノ酸配列を有し、また夫々のCDRのアミノ酸配列が充
 分に保存されていて、上記と同じ特異性が与えられてい
 る。更に、上記ヒト化抗体の製造方法、該方法に用いら
 れる発現ベクター、並びに上記ヒト化抗体を含有する薬
 剤組成物が開示される。

請求の範囲

1. ヒト化抗体であって、そのCDRのアミノ酸配列が、ヒトCD2を導入されたトランスジェニックマウス由来の休止T細胞および活性化T細胞に結合し、該T細胞の増殖を阻害し、且つ該細胞を溶解するような特異性を有するモノクローナル抗体のCDR配列に由来し、また夫々のCDRのアミノ酸配列が十分に保存されていて、上記と同じ特異性が与えられているヒト化抗体。

2. 請求項1に記載のヒト化抗体であって、前記モノクローナル抗体がマウスモノクローナル抗体またはラットモノクローナル抗体であるヒト化抗体。

3. ヒト化抗体であって、該抗体がヒトT細胞抗原に結合できるように、夫々のCDRの下記アミノ酸配列が充分に与えられているヒト化抗体が提供される。

軽鎖: CDR1 (配列ID番号3および4)

CDR2 (配列ID番号5および6)

CDR3 (配列ID番号7および8)

重鎖: CDR1 (配列ID番号11および12)

CDR2 (配列ID番号13および14)

CDR3 (配列ID番号15および16)

4. 請求項1～3の何れか1項に記載の抗体であって、軽鎖可変ドメインのフレームワーク領域が、タンパク [EsIGEV] 1における可変ドメインのフレームワーク領域に対する実質的相同性を有する抗体。

5. 請求項1～4の何れか1項に記載の抗体であって、重

鎖可変ドメインのフレームワーク領域が、タンパクKOLにおける可変ドメインのフレームワーク領域に対する実質的相同性を有する抗体。

6. 請求項1～5の何れか1項に記載の抗体であって、前記CDRが、請求項3で特定した軽鎖のCDR1～3および重鎖のCDR1～3である抗体。

7. 請求項1～6の何れか1項に定義したヒト化抗体を製造する方法であって、前記ヒト化抗体の軽鎖をコードする第一の発現ベクターおよび前記ヒト化抗体の重鎖をコードする第二の発現ベクターで形質転換された宿主を、夫々の宿主が発現される条件下で維持することと、こうして発現された鎖の組み立てにより形成された前記ヒト化抗体を単離することとを具備した方法。

8. 請求項7に記載の方法であって、前記第一の発現ベクターおよび前記第二の発現ベクターが同じベクターである方法。

9. 請求項1～6の何れか1項に定義したヒト化抗体の軽鎖または重鎖をコードするDNA配列。

10. 請求項9に記載のDNA配列を組み込んだ発現ベクター。

11. 請求項10に記載の発現ベクターで形質転換された宿主。

12. 細胞毒剤に結合された請求項1～6の何れか1項に記載のヒト化抗体を具備する免疫毒素。

13. 薬理的に許容され得るキャリアまたは溶剤剤と、請

明 細 書

CDRをグラフトしたヒト化キメラT細胞抗体

本発明は、ヒトCD2を導入されたトランスジェニックマウス (mouse transgenic for human CD2) 由来の休止T細胞および活性化T細胞に結合し、該T細胞の増殖を阻害し、また該T細胞を溶解するヒト化抗体に関する。また、このような抗体の製造および該抗体を含有する薬剤組成物に関する。

抗体は、典型的には、ジスルフィド結合によって連結された二つの重鎖と、二つの軽鎖とを具備している。夫々の軽鎖は、ジスルフィド結合によって重鎖に結合している。夫々の重鎖の一端には、可変ドメインおよびこれに続く多くの定常ドメインを有している。夫々の軽鎖は、一端に可変ドメインを有し、他端に定常ドメインを有している。この軽鎖の可変ドメインは、重鎖の可変ドメインと整合するように並べられている。軽鎖の定常ドメインは、重鎖の最初の定常ドメインと整合するように並べられている。軽鎖および重鎖の定常ドメインは、該抗体の抗原に対する結合には直接関与しない。

軽鎖および重鎖の夫々の対における可変ドメインは、抗原結合部位を形成する。軽鎖および重鎖上の該ドメインは同一の一般構造を有しており、夫々のドメインは、四つのフレームワーク領域 (配列は比較的に保存されている) と、これらを連結する三つの相溶性決定領域 (CDR) とを具備している。この四つのフレームワーク領域は大概βシートコンホメーションをとっており、CDRはαβシート構造を連結するループ

請求項1～6の何れか1項に記載のヒト化抗体とを含有する薬剤組成物。

14. 請求項13に記載の組成物であって、前記ヒト化抗体が細胞毒剤に結合された免疫毒素を含有する組成物。

ブ(場合によってはβシート構造の一部も)を形成している。これらCDRは、フレームワーク領域によって他のCDRに極めて近接した状態で保持されており、抗原結合部位の形成に寄与している。抗体のCDRおよびフレームワーク領域は、Eliel et al. (「免疫学的に興味あるプロモータの配列」; US Dept. of Health and Human Services, US Government Printing Office, 1967) によって決定される。

変異抗体(変異抗体可変ドメインのCDRがフレームワークとは異なった種に由来する)の製造が、E P-A-0239400に開示されている。該CDRは、ラット・モノクローナル抗体またはマウス・モノクローナル抗体から誘導される。この変異抗体における可変ドメインのフレームワーク及び定常ドメインは、ヒト抗体から誘導される。このようなヒト化抗体は、ラット抗体またはマウス抗体に対してヒトが示す免疫応答に比較すると、ヒトに投与されたときに殆ど無視し得る免疫応答しか誘起しない。ヒト化CAMPATH-1抗体(Campath はウエルカム・ファウンデーション社の商標である)が、E P-A-0328404に開示されている。

ヒトT細胞は免疫応答の調節に重要な役割を果たす。従って、抗T細胞抗体は、イン・ビボ投与されたときに免疫抑制剤となり得る。その結果として、このような抗体は、例えば移植/宿主障害、移植拒絶反応、並びにリウマチ性関節炎の治療に有用であり得る。

抗T細胞抗体である非ヒト・モノクローナル抗体が作製されている。しかし、非ヒト・モノクローナル抗体はヒト補体

を特に良好に固定せず、ヒト患者に注射されたときに免疫原となる。WO 89/09612には、ヒト定常ドメイン及びマウス可変ドメインで構成されたキメラ抗体が提案されている。しかし、顕著な免疫原性の問題は未解決のままである。

本発明の一つの側面に従えば、ヒト化抗体であって、そのCDRのアミノ酸配列が、ヒトCD2を導入されたトランスジェニックマウス由来の休止T細胞および活性化T細胞に結合し、該T細胞の増殖を阻害し、且つ該細胞を溶解するような特異性を有するモノクローナル抗体のCDR配列に由来し、また夫々のCDRのアミノ酸配列が充分に保存されている結果、上記と同じ特異性が与えられているヒト化抗体が提供される。

本発明の別の側面に従えば、ヒト化抗体であって、該抗体がヒトT細胞抗原に結合できるように、夫々のCDRの下記アミノ酸配列が充分に与えられるヒト化抗体が提供される。

種類: CDR1 (配列ID番号3および4)

CDR2 (配列ID番号5および6)

CDR3 (配列ID番号7および8)

種類: CDR1 (配列ID番号11および12)

CDR2 (配列ID番号13および14)

CDR3 (配列ID番号15および16)

該抗体は、好ましくは天然抗体またはそのフラグメントの構造を有する。従って、該抗体は完全抗体、(Fab')₂フラグメント、Fabフラグメント、軽鎖二量体または重鎖二量体であり得る。該抗体はIgG1、IgG2、IgG3

もしくはIgG4のようなIgG、またはIgM、IgA、IgEもしくはIgDであり得る。抗体重鎖の定常ドメインは適宜選択される。軽鎖定常ドメインは、カッパ定常ドメイン又はラムダ定常ドメインであり得る。

該抗体は、WO 86/01333に開示されたタイプのキメラ抗体であり得る。WO 86/01333に従うキメラ抗体は、抗原結合領域および非免疫グロブリン領域を具備している。この抗原結合領域は、抗体の軽鎖可変ドメインおよび/または重鎖可変ドメインである。典型的には、該キメラ抗体は軽鎖可変ドメイン及び重鎖可変ドメインを具備している。前記の非免疫グロブリン領域は、この抗原結合領域のC末端に融合される。この非免疫グロブリン領域は、典型的には非免疫グロブリンタンパクであり、酵素領域、公知の結合特異性を有するタンパク由来の領域、タンパク毒素由来の領域、または遺伝子によって発現される何れかのタンパクに由来する領域であり得る。この非免疫グロブリン領域は糖鎖領域であってもよい。該キメラ抗体の二つの領域は、開裂可能なリンカー配列を介して連結される。

種類CDR1-3 (配列ID番号3-B) および重鎖CDR1-3 (配列ID番号11-16)は、抗ヒトT細胞抗体YTH655(5)6のCDRである。このYTH655(5)6はラットIgG2bモノクローナル抗体であり、ヒトCD2を導入されたトランスジェニックマウス由来の休止T細胞および活性化T細胞に結合し、該T細胞の増殖を阻害し、該T細胞を溶解する。ヒト化YTH655抗体の特異性は、ヒトCD2を

導入されたトランスジェニックマウス由来の休止T細胞および活性化T細胞に結合し、該T細胞の増殖を阻害し、且つ該T細胞を溶解する能力によって決定される。

ヒト化抗体のCDRは、適切には上記の種類CDR1-3および重鎖CDR1-3である。しかし、これらCDRのアミノ酸配列は変更され得る。各CDRのアミノ酸配列は、アミノ酸の置換、挿入および/または削除によって最大40%まで(例えば30%まで、20%まで若しくは10%まで)変更され得る。

従って、夫々のCDRには、アミノ酸の置換、挿入および/または削除が一つ又は二つ含まれ得る。種類CDR3または重鎖CDR3には、アミノ酸の置換、挿入および/または削除が三つまで存在し得る。種類CDR1には、アミノ酸の置換、挿入および/または削除が四つまで存在し得る。種類CDR2には、アミノ酸の置換、挿入および/または削除が六つまで存在し得る。好ましくは、各CDRのアミノ酸配列は、抗T細胞抗体YTH655(5)6における各CDRのアミノ酸配列に対して実質的な相同性を有している。

当該抗体のフレームワーク及び定常ドメインは、ヒト・フレームワーク及びヒト定常ドメインである。好ましくは、抗体重鎖における可変ドメインのフレームワークは、ヒト・タンパクKOLの対応するフレームワーク(Schold et al., Biochem-Biophys Res Commun, 364:713-717, 1983)に対して実質的な相同性を有している。フレームワークに関するKOLとの相同性は、一般に80%以上(例えば90%以上

または95%以上)である。アミノ酸の置換、挿入および/または削除が数多く存在し得る。例えば、フレームワーク4の第七残基は適切にはThr又はLeu、好ましくはLeuである。Isbel et al., 1987によれば、この残基はKOLの残基109である。結合を修復するために成され得る他のフレームワーク変異には、アミノ酸残基27, 30, 48, 66, 67, 71, 91, 93及び94が含まれる。アミノ酸のナンバリングはIsbel et al. に従う。

抗体領域における可変ドメインのフレームワークは、典型的には、タンパク質[IGV]の可変ドメイン・フレームワーク(EMBLデータベース: Kaback, B.G., EMBL data library submitted file 111, 1986)に対して実質的な相同性を有している。この配列には452位にフレームシフトが存在する。読取り枠(reading frame)を修正するために、塩基452(T)の削除がなされた。フレームワークに関する[IGV]との相同性は、一般に80%以上(例えば90%以上または95%以上)である。例えば、Isbel et al. のナンバリングに従ったアミノ酸残基-71におけるように、アミノ酸の置換、挿入および/または削除が数多く存在し得る。

ヒト化抗体は、本発明に従う方法によって製造される。この方法は、ヒト化抗体の経緯をコードする第一発現ベクター並びにヒト化抗体の重鎖をコードする第二発現ベクターで形質転換された宿主を、夫々の鎖が発現される条件下で維持することと、こうして発現された鎖の組み立てによって形成されたヒト化抗体を単離することとを具備する。

と。

(3) 現実のヒト化方法論/技術

(4) トランスフェクション及びヒト化抗体の発現。

<ステップ1>

抗体の経緯および重鎖における可変ドメインのヌクレオチド配列および推定アミノ酸配列の決定

抗体をヒト化するためには、抗体の重鎖および軽鎖における可変領域のみが必要であることが知られている。定常ドメインの配列は、再構成ストラテジーに寄与しないので関係がない。抗体の可変ドメインにおけるアミノ酸配列を決定する最も単純な方法は、重鎖および軽鎖の可変ドメインをコードするクローン化されたcDNAから決定することである。

与えられた抗体の重鎖および軽鎖における可変ドメインのcDNAをクローニングするためには、二つの一般的な方法がある。即ち、(1)従来のcDNAライブラリーを介する方法、または(2)ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)を介する方法である。これらの方法は、両者共に広く知られている。該cDNAのヌクレオチド配列が与えられれば、この情報をも、抗体可変ドメインの推定アミノ酸配列に翻訳することは簡単なことである。本発明の例において、ゲッペ類YTH⁶⁵⁵抗体のヌクレオチド配列および推定アミノ酸配列は、配列ID番号1および2(軽鎖)、並びに配列ID番号9および10(重鎖)に示されている。

<ステップ2>

第一および第二の発現ベクターは同じベクターであり得る。更に、本発明は次のものを提供する。

- ・ヒト化抗体の経緯または重鎖をコードする配列を有するDNA。
- ・前記DNA配列を組み込んだ発現ベクター。
- ・前記発現ベクターで形質転換された宿主。

抗体の夫々の鎖は、CDR置換によって製造され得る。得られた抗体が休止T細胞および活性化T細胞に結合できるように、ヒト抗体の経緯または重鎖における可変ドメインのCDRが、YTH⁶⁵⁵の夫々のCDRの充分なアミノ酸配列によって置換される。ヒト抗体鎖の超可変領域をコードするDNAのCDRコード領域が、望ましいCDRをコードするDNAによって置き換えられる。適切な場合には、この変換DNAは抗体鎖の定常ドメインをコードするDNAに連結される。該DNAは発現ベクター中にクローン化される。この発現ベクターは適合する宿主細胞中に導入され、該細胞は抗体鎖が発現されるような条件下で培養される。この方法で同時発現された相補的な抗体鎖は、次いで組み立てられ、ヒト化抗体が形成され得る。

モノクローナル抗体をヒト化するための四つの一般的ステップが存在する。即ち、

- (1) 出発抗体の経緯および重鎖における可変ドメインのヌクレオチド配列および推定アミノ酸配列を決定すること。
- (2) ヒト化抗体を設計すること、即ち、ヒト化プロセスの間に何れの抗体フレームワークを使用するかを決定すること。

ヒト化抗体の設計

ヒト化に際して何れのヒト抗体配列を使用するかを決定する場合、考慮すべき幾つかの因子が存在する。経緯および重鎖のヒト化は相互に独立して考慮されるが、夫々についての論議は基本的に同様である。

この選別プロセスは次の論理に基づいている。即ち、与えられた抗体の抗原特異性および抗原親和性は、主に可変ドメインにおけるCDRのアミノ酸配列によって決定される。可変ドメインのフレームワーク残基による直接的寄与は、極めて小さいか、或いは全くない。フレームワーク領域の主要な機能は、複数のCDRを、抗体を認識するための適切な空間的配向(orientation)で保持することである。従って、ヒト可変ドメインのフレームワークがゲッペ類の可変ドメイン(ゲッペ類CDRの起源)に対して高度の相同性を有しているならば、ゲッペ類のCDRをヒト可変ドメインのフレームワーク中に置換することが、その正しい空間的配向を最も保持し高いように思える。従って、ヒト可変ドメインは、ゲッペ類の可変ドメインに対して高度の相同性を有するように、好ましく選択されなければならない。

適切なヒト抗体の可変ドメイン配列は、次のようにして選択される。

1. コンピュータ・プログラムを用いることにより、ゲッペ類抗体の可変ドメインに対して最も相同性の高いヒト抗体の可変ドメイン配列について、全ての入手可能なタンパク(およびDNA)のデータベースを調査する。適切なプログ

ラムの出力は、ゲッ歯類抗体に対して最も相溶性の高い配列、各配列に対する相溶性パーセント、およびゲッ歯類配列に対する各配列の整列に関するリストである。これは、重鎖および軽鎖の両方の可変ドメイン配列について独立に行なわれる。ヒト免疫グロブリンの配列のみが含まれているとすれば、上記の分析はもっと容易に達成される。

2. ヒト抗体における可変ドメインの配列を列記し、相溶性を比較する。最初に、CDRの長さ（変化が著しい重鎖のCDR3を除く）を比較する。ヒトの重鎖、並びにカッパ軽鎖およびラムダ軽鎖をサブグループに分割する；重鎖は3つのサブグループ、カッパ軽鎖は4つのサブグループ、ラムダ軽鎖は6つのサブグループである。CDRの寸法は、各サブグループ内では同様であるが、サブグループ間では変化する。ゲッ歯類抗体のCDRを、相溶性の一次近似として、ヒト・サブグループの一つに適合させることが通常は可能である。次いで、同様の長さのCDRを有する抗体が、アミノ酸配列の相溶性について比較される。この比較は、特にCDR内において行なわれるが、周囲のフレームワーク領域においても行なわれる。最も相溶性の高いヒト可変ドメインが、ヒト化のためのフレームワークとして選ばれる。

<ステップ3>:

現実のヒト化方法論/技術

E P-A-0239400 に従い、所望のCDRをヒト・フレームワークにグラフトすることによって、抗体はヒト化される。従って、所望の再構成された抗体をコードするDNA配

列は、そのCDRを再構成しようとするヒトDNAを用いて開始することにより作製され得る。所望のCDRを含むゲッ歯類の可変ドメインにおけるアミノ酸配列が、選択されたヒト抗体の可変ドメイン配列と比較される。ヒト可変領域にゲッ歯類CDRを組み込むために、ゲッ歯類の対応残基に交換する必要があるヒト可変ドメイン残基がマークされる。また、ヒト配列中の置換すべき残基、該配列に追加すべき残基または該配列から削除すべき残基も存在し得る。

ヒト可変ドメインを突然変異変換して所望の残基を含ませるために用いることができるオリゴヌクレオチドが合成される。これらオリゴヌクレオチドは、何れか都合のよい大きさとすることができる。通常は、入手可能な特定の合成機で合成可能な長さにおいてのみ制限される。オリゴヌクレオチドに指令されたイン・ヒトロでの突然変異誘発法は、広く知られている。

或いは、WO 92/07075 の組換えポリメラーゼ連鎖反応法（PCR）を用いてヒト化を達成してもよい。この方法論を用いると、ヒト抗体のフレームワーク領域の間のCDRがスプライスされる。

一般に、英国特許出願第9022411.2号の技術は、二つのヒト・フレームワーク領域（A BおよびC D）並びにその間のCDR（ドナーCDRによって置換されるべきもの）を具備したテンプレートを用いて行なわれる。プライマーAおよびプライマーBはフレームワーク領域A Bを増幅するために用いられ、プライマーCおよびプライマーDはフレームワーク

領域C Dを増幅するために用いられる。しかし、プライマーBおよびプライマーCの夫々の5'末端には、ドナーCDR配列の全部または少なくとも一部に対応した追加の配列が含まれている。プライマーBおよびプライマーCは、PCRが行なわれ得る条件下において、これらの5'末端が相互にアニールされるに十分な長さで重なる。従って、増幅された領域A BおよびC Dは、オーバーラップおよび伸長による遺伝子スプライシングを受け、単一の反応でヒト化された生成物が製造される。

<ステップ4>:

トランスフェクションおよび再構成抗体の発現

抗体を再構成するための突然変異誘発反応に続いて、変異誘発されたDNAは、軽鎖または重鎖の定常ドメインをコードする適切なDNAに連結され、発現ベクター中にクローン化され、宿主細胞（好ましくは哺乳類細胞）中にトランスフェクトされ得る。これらのステップは、常法に従って行なうことができる。従って、再構成抗体は下記（a）～（d）を具備したプロセスによって製造され得る：

（a）1gの重鎖または軽鎖の少なくとも可変ドメインをコードするDNA配列に操作可能に連結された適切なプロモータを含み、該可変ドメインがヒト抗体由来のフレームワーク領域および本発明のヒト化抗体に要求されるCDRを具備する、第一の複製可能な発現ベクターを調製すること。

（b）相補的1gの軽鎖および重鎖の少なくとも可変ドメインを夫々コードするDNA配列に操作可能に連結された適

切なプロモータを含む、第二の複製可能な発現ベクターを調製すること。

（c）細胞ラインを、上記で調製された第一のベクターまたは両方のベクターで形質転換すること。

（d）前記形質転換された細胞ラインを培養し、前記変異抗体を製造すること。

好ましくは、ステップ（a）におけるDNA配列は、ヒト抗体類の該可変ドメインと、該定常ドメイン又は夫々の定常ドメインとの両方をコードする。このヒト化抗体は回収され、複製され得る。変異抗体を産生するように形質転換される細胞ラインは、チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞ライン、または不死化された哺乳類細胞ライン（中でもミエローマ、ハイブリドマ、トリオーマ（trisoma）またはクワドローマ（quadrasma）細胞ラインのようなリンパ起源のものが有利）であり得る。この細胞ラインはまた、ウイルス（例えばエプスタインバー・ウイルス）での形質転換により不死化されたB細胞のような、正常なリンパ球であってもよい。最も好ましくは、この不死化された細胞ラインはミエローマ細胞ライン又はその誘導体である。

ヒト化抗体の製造に用いられる細胞ラインは好ましくは哺乳類細胞ラインであるが、その代わりに、他の何れかの適切な細胞ライン、例えばバクテリア細胞ライン又は酵母細胞ラインを用いてもよい。第一の抗体類については、E. coli 由来のバクテリア株を用い得ることが予想される。得られた抗体は機能をチェックされる。もし機能が喪失していれば、ス

チップ(2)に戻って抗体のフレームワークを変更する必要がある。

発現された本発明の全抗体、その二量体、個々の軽鎖および重鎖、または他の免疫グロブリン形は、例えアンモニウム沈殿、アフィニティカラム、カラムクロマトグラフィー、ゲル電気泳動等のような当該技術における標準的な手法(一般には、Scopes, R., *Protein Purification*, Springer-Verlag, N.Y. (1982) を参照のこと)に従って精製することができる。薬剤としての用途に使用するためには、少なくとも約90%~95%の均一性をもった実質的に純粋な免疫グロブリンが好ましく、98%~99%以上の均一性をもったものが最も好ましい。部分的に又は所望の均一さにまで精製されたら、ヒト化抗体は治療的に用いられ、或いは免疫蛍光染色等の試験操作の開発および実施に用いられ得る(一般には、*Immunological Methods*, Vol. I and II, Lefkowitz and Fagan, eds., Academic Press, New York, N.Y. (1979 and 1981) を参照のこと)。

ヒトT細胞抗原特異性の抗体の典型的な用途は、T細胞に媒介された疾病状態の治療にある。一般に、疾病に関連する細胞がT細胞抗原を有するものであると特定された場合は、該T細胞抗原に結合できるヒト化抗体が適切である。例えば、治療に適した典型的な疾病状態には、心臓、肺、腎臓、肝臓等の臓器移植を受けた患者における移植/宿主病および移植拒絶が含まれる。他の疾病には自己免疫疾患、例えばI型糖尿病、多発性硬化症、リウマチ性関節炎、全身性紅斑性狼瘡

および重症筋無力症が含まれる。

本発明のヒト化抗体はまた、他の抗体と組み合わせて、特に、疾病の原因細胞表面の他のマーカーと反応するヒトモノクローナル抗体と組み合わせて使用され得る。適切なT細胞マーカーには、例えば、第1回国際白血球分化ワークショップにより命名された、所謂「分化群(Clusters of Differentiation)」に分類されたものが含まれる(Gentile, T., et al., eds., Springer-Verlag, N.Y. (1984))。

この抗体はまた、化学療法剤または免疫抑制剤と関連して別途投与される組成物としても使用され得る。典型的には、この薬剤には、シクロスポリンAまたはプリン類縁体(例えばメソトレキセート、6-メルカプトプリン等)が含まれるが、それ以外にも、当業者に周知の多くの薬剤(例えばシクロホスファミド、プレドニゾン等)もまた用いられ得る。

本発明の抗体は免疫毒素の一部を形成する。免疫毒素は二つの成分によって特徴づけられ、イン・ビトロまたはイン・ビボにおいて、選択された細胞を死滅させるために特に有用である。一つの成分は細胞毒素剤であり、通常、これを付着または吸収した細胞は死に至る。「デリバリー阻体」として知られる第二の成分は、毒素剤を特定の細胞タイプ、例えば癌性腫瘍を構成する細胞へ運ぶための手段を提供する。この二つの成分は、普通は、種々の周知の化学的手法の何れかによって一緒に結合される。例えば、細胞毒剤が蛋白であり、第二成分が完全な免疫グロブリンであるとき、この結合はヘテロ二官能架橋剤(例えばSPDP、カルボジイミド、グル

タルアルデヒド等)によって行なわれ得る。当該技術において種々の免疫毒素が周知であり、例えば「モノクローナル抗体/毒素複合体: 魔法の弾丸を目指して」(Thorpe et al., *Monoclonal Antibodies in Clinical Medicine*, Academic Press, pp. 168-190 (1982)) 中に見出すことができる。

免疫毒素としての用途に適した種々の細胞毒素剤がある。細胞毒素剤には、放射性核種(例えばヨウ素-131、イットリウム-90、レニウム-188及びビスマス-213); 多くの化学療法剤(例えばビンデシン、メソトレキセート、アドリアマイシン及びシスプラチン); 細胞毒タンパク(例えばボークウィード抗ウイルスタンパク、シュードモナスエキソトキシンA、リシン、ジフテリア毒素、リシンA鎖等のようなリボソーム阻害タンパク、或いはホスホリパーゼ酵素(例えばホスホリパーゼC)のような細胞表面で活性なタンパク)が含まれる。一般には、「キメラ毒素」(Olsson and Phil, *Pharmac. Ther.*, 25:335-381 (1983)) 並びに「癌の検出および治療のためのモノクローナル抗体」(eds. Balfe and Biers, p. 155-179, 224-266, Academic Press (1985)) を参照されたい。

免疫毒素のデリバリー成分は、本発明によるヒト化抗体である。完全な免疫グロブリン又はFabのようなその結合性フラグメントが好ましく用いられる。典型的には、免疫毒素における抗体は、ヒトIgA、IgMまたはIgGアイソタイプであるが、所望に応じて他の哺乳類定常ドメインが利用され得る。

本発明は更に、薬剤的に許容され得るキャリアまたは稀釈剤と、活性成分としての本発明によるヒト化抗体とを含有する薬剤組成物を提供する。この組成物は、本発明に従う免疫毒素を含有してもよい。本発明のヒト化抗体、免疫毒素およびその薬剤組成物は、非経腸的投与(即ち皮下投与、筋肉内投与または静脈内投与)に特に有用である。

非経腸的投与のための組成物は共通して、許容可能なキャリア(好ましくは水性キャリア)中に溶解された抗体の溶液またはそのカクテルからなっている。種々の水性キャリア(例えば水、緩衝水、0.4%生理食塩水、0.4%グリシン等)を使用することができる。これら溶液は滅菌されており、また一般には粒子物質を含まない。これら組成物は、従来周知の滅菌技術によって滅菌され得る。該組成物は、生化学的條件に近似させるために必要とされる、pH調節および緩衝剤、毒性調節剤等のような薬剤的に許容可能な任意成分、例えば酢酸ナトリウム、塩化ナトリウム、塩化カリウム、塩化カルシウム、乳酸ナトリウム等を含有してもよい。これら処方中の抗体濃度は、例えば、約0.5重量%未満から、通常は約1重量%以上、最大で1.5重量%または2.0重量%までと広範囲に変化させることができ、選択された投与方法に従い、主に液体容量、粘度等に基づいて選択される。

筋内注射のための典型的な薬剤組成物は、1mlの滅菌緩衝水および50mgの抗体を含有するように調整することができる。静脈注射のための典型的な薬剤組成物は、150mlの滅菌リンゲル溶液および150mgの抗体を含有するように

調製することができる。非経腸的に投与可能な組成物を調製するための真原の方法は、当業者にとっては公知もしくは明らかであり、例えば *Biological's Pharmaceutical Science*, 15th ed., Mark Publishing Company, Easton, Pennsylvania (1980) の中により詳細に説明されている。

本発明の抗体は凍結乾燥して貯蔵し、使用に先立って、適切なキャリア中で再生することができる。この技術は、従来の免疫グロブリンについて有効であることが示されている。適切な凍結乾燥および再生技術は何れも用いることができる。当業者は、凍結乾燥および再生によって種々の程度での抗体活性の喪失がもたらされ（例えば、従来の免疫グロブリンでは、1 g M抗体は1 g G抗体よりも活性喪失が大きくなる傾向がある）、使用レベルを調節して補償しなければならぬことを理解するであろう。

本発明のヒト様抗体を含有する組成物またはそのカクテルは、予防および/または治療のために投与され得る。治療的適用において、組成物は、既に疾病に罹患している患者に対し、該疾病およびその合併症を治療し、または少なくとも部分的に抑制もしくは緩和するために十分な量で投与される。これを達成するのに十分な量は、「治療的有効投与量」と定義される。この用途のための有効量は、感染の重篤度および患者自身における免疫系の一般状態に依存するが、一般的には1回の投与量当たりの抗体量は約1〜約200 mgであり、より普通には患者当たり5〜25 mgの投与量が用いられる。本発明の物質は一般に、深刻な疾病状態、即ち生命が脅かさ

れ若しくは生命が脅かされる可能性のある状態に用いられることに留意しなければならない。このような症例においては、外因性物質を最小限とし、また「外来物質」拒絶の可能性を低減する（これは本発明のヒト様抗体によって達成される）という観点から、実質的に過剰量のこれら抗体を投与することが可能であり、また主治医はそれを望ましいと思うかも知れない。

予防的適用において、本発明の抗体を含有する組成物またはそのカクテルは、患者の抵抗力を高めるために、未だ疾病自体にない患者に投与される。このような投与量は「予防的有効投与量」と定義される。この用途においても、精密な量は患者の健康状態および免疫の一般的レベルに依存するが、一般的には1回の投与量当たりの抗体量は0.1〜25 mgの範囲であり、特に患者当たり0.5〜2.5 mgの投与量が用いられる。好ましい予防的用途は、腎臓移植拒絶の防止である。

当該組成物の一回投与または多回数投与は、主治医が選択した投与量レベルおよびパターンで行なわれる。何れにしても、薬剤処方、患者を効果的に治療するために充分な量の本発明の抗体を与えなければならない。

本発明のヒト様抗体は更に、イン・ビトロにおける広範な有用性を有し得る。例を挙げると、典型的な抗体は、T細胞をタイピングするため、特異的YTH 655抗原を有する細胞または該受容体のフラグメントを単離するため、並びにワクチンの製造等のために利用することができる。

診断目的において、当該抗体はラベルされてもよく、或いはラベルされなくてもよい。ラベルされない抗体は、該ヒト抗体と反応するラベルされた他の抗体（第二抗体）、例えばヒト免疫グロブリンの定常領域に特異的なラベルされた抗体と組み合わせて用いることができる。或いは、該抗体を直接ラベルすることもできる。放射性核種、蛍光体、酵素、酵素基質、酵素共因子、酵素阻害剤、リガンド（特にハプテン）等のような広範なラベルが使用され得る。多種類の免疫検定が利用可能であり、これら免疫検定は当業者に周知である。

細胞活性に対する保護、または細胞活性もしくは選択された抗原の存在の検出において、本発明の抗体と共に使用するためのキットも提供される。即ち、本発明のヒト化抗体は、単独または所望の細胞タイプに特異的な追加の抗体と共に、通常は容器内の凍結乾燥された形態で提供されてもよい。抗体は、ラベルまたは毒素に結合されても結合されなくてもよい。また、該抗体は緩衝液（例えばトリス緩衝液、リン酸緩衝液、炭酸緩衝液等）、安定剤、殺菌剤、不活性タンパク（例えば血清アルブミン）等の、および使用説明書のセットと共にキットに含まれる。これらは、活性抗体の量を基準にして、一般的には約5重量%未満、通常は全量で少なくとも約0.001重量%で存在せしめる。しばしば、活性成分を稀釈するための不活性な増量剤または賦形剤を含めるのが望ましく、その場合、賦形剤は全組成物の約1〜99重量%で存在せしめ得る。当該キメラ抗体に結合できる第二抗体を試験または検定に用いる場合、通常はこれを別の類に収容する。

この第二抗体は典型的にはラベルに結合され、上記の抗体処方と同様にして処方される。

例 1:

MR 14細胞に対するヒト化YTH 655の結合

ヒト化YTH 655 (HUMCD2) の活性が、MF 14と称する活性化T細胞ラインを用いたFACSによって試験された。ヒトIgG₁の定常ドメインおよびYTH 655の可変ドメインを含むキメラYTH 655 (CHIMCD2) が、対照として用いられた。細胞は先ず、キメラYTH 655またはヒト化YTH 655と共にインキュベートされた。洗浄の後、細胞は商業的に入手可能な抗ヒトFITCと共にインキュベートされ、次いでFACS (fluorescence activated cell sorting) によって分析された。図は、ヒト化YTH 655の結合性がキメラYTH 655の結合性と等価であること、並びにヒト化YTH 655の結合が力価測定され得ることを示している。従って、ヒト化モノクローナル抗体の抗原特異性は維持されていた。

以下の実施例は、本発明を例示するものである。

YTH 655抗体H鎖のクローニングと配列決定

YTH 655抗体のVH領域をコードするcDNAを、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)に基づく方法(Orlowski et al., PNAS 86A, 86:3833-3837, 1989)をいくらか変更した方法を用いて単離した。全RNAが、グアニジンチオシアネート法(Chirgwin et al., Biochemistry, 18:5294, 1979)によってハイブリドーマ細胞から単離された。また、ポリ(A)・RNAは、全RNAをポリUセファロース4Bカラム(Pharmacia, Lillie, Essex, U.K.)に通し、溶出させることにより単離された。第一鎖を合成するために、5μgのポリ(A)・RNAを、250μMの各dNTP、10mMのジチオスレイトール、50mMのトリスHCl(42℃でpH8.2)、10mM・MgCl₂、100mM・KCl、10ピコモルのV_Hドメインに対して特異的なプライマー-VH₁FOR [5'-4(TGA GGA GAC GGT GAC GGT GGT CCC TIG GCC (CA) 6)]、およびジエチルピロカルボネート(DEPC)処理した蒸留水と混合し、24μlとした。これを70℃で10分間加熱し、その後42℃で10分間加熱した後、23単位のスーパーRT(AMV逆転写酵素; Amplitaq, Cetus, Beverly, MA)を加えた。これを42℃で1時間反応させた。

引き続きPCR増幅において、50μlのPCR増幅反応液は、5μlの第一鎖合成反応液(未精製)、500μMの各dNTP、67mMのトリスHCl(25℃でpH8.8)

、17mM・NH₄SO₄、10mM・MgCl₂、20μg/mlのゼラチン、5単位のTAQ・DNAポリメラーゼ(Eckhardt, Boverhill, U.K.)、25ピコモルのプライマー-VH₁FORと、25ピコモルの混合プライマー-VH₁BACK [5'-4(AGG T(CG) (CA) 3(GA) TGG AG(CG) AGT (TA) 6) 6]からなっていた。反応液をミネラルオイル層で覆った後、Technique-PHC-1プログラマブルサイクリクリアクターを用いて、95℃で1.5分間(変性)、50℃で3分間(アニーリング)および72℃で3分間(伸長)のサイクルで30サイクル反応させた。最後のサイクルには、10分間の伸長時間を含めた。

サンプルを-20℃で凍結し、ミネラル油(-20℃で粘性の液体)を吸引で除去した。水相を凍結し、2%アガロースで電気泳動した後に、350bpのPCR生成物を精製した。このPCR生成物を、PstI及びBstEIIの二つで切断した。当初、これをベクター-M13VH・PCR1(Orlowski et al., 1989)のPstI及びBstEII制限部位にクローニングした。しかし、作成したクローンの配列をジデオキシセクエンターミネーション法(Sanger et al., PNAS 85A 74:5463-5467, (1977))で調べたところ、YTH 655 VH遺伝子は、CDR2とCDR3の間のフレームワーク領域に位置した内部PstI制限部位を含むことがわかった。代りのクローニング方法として、該PCR生成物をPstIのみで消化し、M13mp18(Yislocky-Peterson et al., Gene 33, 103-119, 1985)のPstI部位にクローニングした。結

いて、M13mp18からPstIフラグメントを単離し、これをM13VHPCR1(VHPstI-BstEIIフラグメントを含む)のPstI部位にクローニングすることにより、完全なVH遺伝子を再構築した。PstIフラグメントの正確な配位(orientation)は、ジデオキシ配列分析によって決定された。最後に、YTH 655 VH遺伝子が内部PstI部位を一つだけ含むこと(即ち、段階的クローニング方法の結果としてDNAがまったく失われていないこと)を確認するために、該部位を含む60bpフラグメントがクローニングされ、配列が決定された。この60bpのフラグメントは、VH・PCR生成物をXmnI-BglIIで2重切断し、次いでM13mp19のHincII-BamHI部位にクローニングすることによって生じた。

独立のPCR増幅で得たランダムなVH・PCR生成物のヌクレオチド配列分析、並びに独立のRNA分離によって、単一のVHドメインcDNAが明らかになった。cDNAの配列と推定アミノ酸配列については後述する。VH領域をコードする他のクローンは見つからなかったため、この配列は、YTH 655抗体遺伝子に由来するものと思われる。

YTH 655抗体のL鎖のクローニングと配列決定

ハイブリドーマ細胞からの全RNAが、グアニジンチオシアネート法(Chirgwin et al., Biochemistry, 18:5294, 1979)によって単離された。全RNAからmRNAを抽出するために、ダイナビーズオリゴ(dT)₃₀(Dynal社)が、製

造業者のプロトコルに従って用いられた。

cDNA合成用スーパースクリプトプラスミドシステム及びプラスミドクローニングのためのキット(BRL社)を用い、製造業者の推薦する方法に従って、単離したmRNAからcDNAを合成し、これをプラスミドpSPORT-1にクローニングした。その結果得られたcDNA/pSPORT-1ライゲーション生成物により、大腸菌Max Efficiency DE5 Competent Cells(BRL社)が形質転換された。約5,000コロニーがハイボンダイロニフィルター(American)上に懸置され、Bellevue et al.(Nucleic Acids Res. 17, 452, 1989)の方法に従って溶解し、変性して固定した。フィルターを55℃で30分間、0.2×SSC、0.1%SDS中のプロテナーゼK(50μg/ml)で処理し、過剰の試液をティッシュで除去した。

短縮L鎖に関するM13ファージ上清が、フィルターをスクリーニングするプローブを調製するために用いられた。このM13ファージ上清は、M13のリバースプライマー及びユニバーサルプライマー、並びに2μlの³²P-ATPを用いることにより、PCR反応にかけられた。フィルターは、Church & Gilbertの方法(PNAS, 81, 1991-1995, 1982)に従い、ハイブリッド形成溶液において、25μlの放射活性プローブを用いてスクリーニングされた。略30の陽性的陽性のコロニーが検出された。陽性クローンから、Bellevueの方法(Nucleic Acids Research 16, 9878, 1988)を用いて、プラスミドDNAが調製された。このDNAを、NotIおよび

びS₁で制限分解した後、既述の³²P-M13ファージ上清プローブを用いたサザンブロットにより分析した。4つの陽性クローンの配列が、T7、T3、及びフレームワーク4プライマーを使って、ジデオキシシチエンターミネーション法 (Sanger et al., PNAS, USA, 74, 5463-5467, 1977) に従って決定された。3つのクローンは短縮型YTH 655抗体L鎖であり、1つのクローンは完全な長さのYTH 655抗体L鎖であった。完全な長さのクローンは、ジデオキシシチエンターミネーション法を用いて配列が完全に決定された。

キメラ抗体の設計

前述のステップ2で説明した選別方法を用いることにより、KOL重鎖 (Kabat et al., 1987) のヒト可変領域フレームワークと、H5ICKV111軽鎖 (EMBLデータベース; 1986年4月7日に提出された Klobect, H. G. EMBLデータライブラリー) がヒト化プロセスのために選ばれた。

ヒト化したH鎖とL鎖遺伝子の構造

ヒト化したH鎖とL鎖は、次のLevle とCraze (Gene 101, 397-398, 1991) の方法にしたがって構築された。

(1) L鎖

L鎖オリゴヌクレオチドプライマー

- A.: 配列ID番号17;
- B.: 配列ID番号18;
- C.: 配列ID番号19;
- D.: 配列ID番号20;

プロトコルに従って精製された。各精製物の1/4を使って、フラグメントAB、とCD、並びにフラグメントEF、とGH、を夫々結合した。この夫々について、プライマーA、及びD、またはプライマーE、及びH、を用いた組換えPCR反応を行った。これらの反応生成物、即ちフラグメントAD、およびフラグメントEH、を上記のように精製し、これら夫々の生成物の1/4を、プライマーA、およびH、を用いた組換えPCR反応において結合させた。最終的なヒト化L鎖組換えPCR生成物 (即ちAH、) は、(Levle et al., 1991)の方法に従って、プライマーA、およびH、におけるHind III部位を利用して、プラスミドpUC-18 (BR、) のHind III部位にクローニングされた。ジデオキシシチエンターミネーション法を用いることにより、単離したプラスミドの配列を決定し、正しい配列のクローンを選択した。

(1.1) H鎖

H鎖オリゴヌクレオチドプライマー

- A.: 配列ID番号25;
- B.: 配列ID番号26;
- C.: 配列ID番号27;
- D.: 配列ID番号28;
- E.: 配列ID番号29;
- F.: 配列ID番号30;
- G.: 配列ID番号31;
- H.: 配列ID番号32;

PCRのための最初の鋳型は、ヒト化抗CD4重鎖 (K

E.: 配列ID番号21;

F.: 配列ID番号22;

G.: 配列ID番号23;

H.: 配列ID番号24;

PCR反応 (Saito et al., Science 238, 487-491, 1988) が、プログラム可能なヒーティングブロック (Hybaid) 中において、温度サイクル (94℃で1分30秒、50℃で2分、72℃で3分) を20サイクル繰り返した後、最後に72℃で10分保持することにより行われた。製造業者が推奨するように、800ngの各プライマー、特定量の鋳型、および2.5単位のTaqポリメラーゼ (Perkin Elmer Cetus) を、反応緩衝液と共に100μlの最終容量とした。

このPCRのための最初の鋳型は、先にヒト化された H5ICKV111 L鎖であった。これは、H5ICKV111フレームワークを有するヒト・カッパL鎖であり、続いて部位指向性突然変異を受けて、CDRL1、CDRL2およびCDRL3をラット抗ジゴキシンモノクローナル抗体 (D148) のCDRL1、CDRL2およびCDRL3に置き換えられたものである。

最初に、4つの一次PCR反応が行われた。夫々の反応は、10ngの鋳型と各プライマー対、即ちA、とB、とのプライマー対、C、とD、とのプライマー対、E、とF、とのプライマー対またはG、とH、とのプライマー対とを使って行われた。これらPCR反応の生成物、即ち、夫々のフラグメントAB、CD、EF、およびGH、は、Prep-A-Gene (BioRAD) を用いて、生産者が推奨するプ

OLフレームワーク上にある。70 92/05274;Gershen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88, 1971) で、ゲノムDNAからcDNAに転換されたものである。上記の組換えPCR法に従って、この鋳型にゲノムDNAのCDRがグラフトされた。ただし、このPCR法では、オリゴヌクレオチドプライマーA、~H、gを用いられた。オリゴヌクレオチドA、およびH、は、ヒト化可変領域の最初のクローニングを可能にするために、夫々Hind IIIおよびEcoRI部位で設計された。また、その後の選択された適切な定常領域を有する可変領域のクローニングを容易にするために、SpeI部位が、オリゴヌクレオチドG、のKOLフレームワーク4 (FR4) 領域に導入された。このSpeI部位は、ヒト化抗CD4-H鎖鋳型の109番目 (ナンバリングはKabat et al., 1987による) のスレオニン残基 (KOLではプロリン) をロイシン残基 (6つのヒトH鎖J遺伝子断片のうち4つがこの位置にロイシンを有する; Kabat et al., 1987) にかえた。ヒト化H鎖の可変領域組換えPCR生成物は、Hind III/EcoRIで切断したpUC-18 (BR、) 中にクローニングされ、正しい配列をもった単離プラスミドが選択された。ヒト化抗CD4重鎖のFR4およびc1定常領域が、オリゴヌクレオチドプライマーX、(配列ID番号33) およびY、(配列ID番号34) を用いて、pUC-18 (BR、) 中にPCRクローニングされた。プライマーX、はSpeI部位およびHind III部位を含み、Y、はEcoRI部位を含んでいる。Hind IIIおよびEcoRI部位を用いて、

配列表

(1) 一般情報

(i) 出願人

(A) 名称: ウエルカム・ファウンデーション・
リミテッド

(B) 通り: ユニオンハウス, ユーストンロード 160

(C) 市: ロンドン

(D) 国: 英国

(E) 郵便番号 (ZIP): NW1 2BP

(A) 氏名: ワルドマン, ヘルマン

(B) 通り: ケンブリッジ大学, 病理学部, 免疫科

(C) 市: テニスコートロード, ケンブリッジ

(D) 州: ケンブリッジシア

(E) 国: 英国

(F) 郵便番号 (ZIP): CB2 1QP

(A) 氏名: ウオルシュ, ルイス

(B) 通り: ケンブリッジ大学, 病理学部, 免疫科

(C) 市: テニスコートロード, ケンブリッジ

(D) 州: ケンブリッジシア

(E) 国: 英国

(F) 郵便番号 (ZIP): CB2 1QP

(ii) 発明の名称: 抗体

(iii) 配列の数: 34

PCR生成物がpUC-1B中にクローニングされ、正しい配列をもった単離プラスミドが選択された。続いて、設計したFR4・Spe1部位を用いることにより、ヒト化可変領域クローンおよびγ1定常領域クローンから、完全なH鎖が再構築された。

ヒト化YTH 655のH鎖とL鎖は、ヒトサイトメガロウイルスプロモーターに支配された真核生物発現ベクター中にクローニングされ、COS細胞内において、IgG・ELISAの測定では200ng/mlのレベルで一時的に発現された。ヒト化YTH 655のH鎖およびL鎖を発現する安定な細胞ラインは、NSO細胞に、COS細胞のトランスフェクションに使ったのと同じ真核細胞発現ベクターをトランスフェクトすることによって作製された。YTH 655、並びにヒトIgG1定常領域およびYTH 655の可変領域を含むキメラYTH 655は、活性T細胞ラインであるMF14に結合することがFACS分析によって示された。FACS (Weir D.M. 1985 *Handbook of Experimental Immunology* Vol 1 and 2 414 Ed-Blackwell Scientific Publications, Oxford) で測定したとき、MF14細胞に結合するヒト化YTH 655 [4μg/μg] は、ラットYTH 655 [4μg/μg] およびキメラYTH 655 [4μg/μg] の結合と等価であった。従って、ヒト化モノクローナル抗体の抗原特異性は保持されていた。FACS分析によって、ヒト化YTH 655のMF14細胞への結合は濃度依存性であることが示された。

(iv) コンピュータ読取り可能な形態

(A) 媒体タイプ: フロッピーディスク

(B) コンピュータ: IBM・PC, コンパチブル

(C) オペレーティングシステム:

PC-DOS/MS-DOS

(D) ソフトウェア:

Patentia Release 11.0, Version 11.25 (IPC)

(v) 先の出願データ

(A) 出願番号: GB 91 25179.6

(B) 出願日: 1991年12月6日

(2) 配列ID番号1の情報

(i) 配列の特徴

(A) 長さ: 330 塩基対

(B) 型: 鎖状

(C) 鎖の数: 二本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 分子の種類: cDNA

(iii) 特徴

(A) 特徴を表す記号: CDS

(B) 位置: 1-330

(vi) 配列の記載: 配列ID番号1

GAT GTT CTC ATC ACA CAA ACT CCA CTC TCC CTC CCT GTC ACC GTT GGA	48
Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Val Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly	10 33
CCT CAA GGC TCT ATC TCT TCC CGC TCA AGT CAG ACC CTC GTA CAG ACT	96
Gly Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser	20 23 30
AAT GGA AAC ACC TAC TTG CAT TCC TAC CTC CAG AAG CCA GGC CAG TCT	144
Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser	33 40 43
CCA CAG CTC CTC ATC TAT CGG GTT TCC AAC AGA TTT TCT CGC GTC CCA	192
Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro	30 33 60
GAC AUG TTC AAT GGC AGT GCG TCA GCG ACA GAT TTC ACC CTC AAG ATC	240
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile	63 70 73 80
ACC AGA GTA GAG CCT GAG GAG TTG GGA GAT TAT TAC TCC TTA CAA AGT	288
Ser Arg Val Gln Pro Gln Asp Leu Gly Asp Tyr Tyr Cys Leu Gln Ser	83 90 93
ACA CAT TTT CCG TAC ACC TTT GGA CCT GCG ACC AAG CTC CAA	330
Thr His Phe Pro Tyr Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Gln	100 103 110

(2) 配列ID番号2の情報

(i) 配列の特徴

(A) 長さ: 110 アミノ酸

(B) 型: アミノ酸

(D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 分子の種類: タンパク

(vi) 配列の記載: 配列ID番号2

Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Val Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly
1 3 10 15
Gly Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
10 25 30
Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45
Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80
Ser Arg Val Glu Pro Glu Asp Leu Gly Asp Tyr Tyr Cys Leu Gln Ser
85 90 95
Thr His Phe Pro Tyr Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu
100 105 110

(2) 配列 I D 番号 3 の情報

(i) 配列の特徴

- (A) 長さ: 48塩基対
- (B) 型: 複製
- (C) 鎖の数: 二本鎖
- (D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 分子の種類: cDNA

(12) 特徴

- (A) 特徴を表す記号: CDS
- (B) 位置: 1-48

(11) 配列の記載: 配列 I D 番号 3

CCG TCA AGT CAC ACC CTC GTA CAC AGT AAT CGA AAC ACC TAG TTC CAT
Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His
1 5 10 15

(2) 配列 I D 番号 6 の情報

(i) 配列の特徴

- (A) 長さ: 1 アミノ酸
- (B) 型: アミノ酸
- (D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 分子の種類: タンパク

(11) 配列の記載: 配列 I D 番号 6

Arg Val Ser Asn Arg Phe Ser
1 5

(2) 配列 I D 番号 7 の情報

(i) 配列の特徴

- (A) 長さ: 27塩基対
- (B) 型: 複製
- (C) 鎖の数: 二本鎖
- (D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 分子の種類: cDNA

(12) 特徴

- (A) 特徴を表す記号: CDS
- (B) 位置: 1-27

(11) 配列の記載: 配列 I D 番号 7

TTA CAA AGT ACA CAT TTT CCG TAC ACC
Leu Gln Ser Thr His Phe Pro Tyr Thr
1 5

(2) 配列 I D 番号 4 の情報

(i) 配列の特徴

- (A) 長さ: 16 アミノ酸
- (B) 型: アミノ酸
- (D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 分子の種類: タンパク

(11) 配列の記載: 配列 I D 番号 4

Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His
1 5 10 15

(2) 配列 I D 番号 5 の情報

(i) 配列の特徴

- (A) 長さ: 21塩基対
- (B) 型: 複製
- (C) 鎖の数: 二本鎖
- (D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 分子の種類: cDNA

(12) 特徴

- (A) 特徴を表す記号: CDS
- (B) 位置: 1-21

(11) 配列の記載: 配列 I D 番号 5

CGG GTT TCG AAC AGA TTT TCT
Arg Val Ser Asn Arg Phe Ser
1 5

(2) 配列 I D 番号 8 の情報

(i) 配列の特徴

- (A) 長さ: 9 アミノ酸
- (B) 型: アミノ酸
- (D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 分子の種類: タンパク

(11) 配列の記載: 配列 I D 番号 8

Leu Gln Ser Thr His Phe Pro Tyr Thr
1 5

(2) 配列 I D 番号 9 の情報

(i) 配列の特徴

- (A) 長さ: 297塩基対
- (B) 型: 複製
- (C) 鎖の数: 二本鎖
- (D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 分子の種類: cDNA

(12) 特徴

- (A) 特徴を表す記号: CDS
- (B) 位置: 1-297

(11) 配列の記載: 配列 I D 番号 9

GGA GGT TTC GTC AAA CCF GGG GCT TCT CTC AAA CTC TCT TGT GTA CCG
Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser Leu Lys Leu Ser Cys Val Ala
1 3 10 13

TCC GGA TTC ACT TTC ACT GAC TAC TGG ATC AGC TGG GTT CCG CAG ACT
Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Thr
20 25 30

CCT GGA AAG ACC ATC GAG TGG ATT GGA GAT ATT AAA TAT CAT CCG ACT
Pro Gly Lys Thr Met Glu Trp Ile Gly Asp Ile Lys Tyr Asp Gly Ser
35 40 45

TAC ACA AAT TAT GGA CCA TCC CTA AAG AAT GGA TTC ACA ATC TCC ACA
Tyr Thr Asn Tyr Ala Pro Ser Leu Lys Asn Arg Phe Thr Ile Ser Arg
50 55 60

GAC AAT GCC AAG ACC ACC CTG TAC CTG CAG ATC AGC AAT CTG ACA TCT
Asp Asn Ala Lys Ser Thr Leu Tyr Leu Gln Met Ser Asn Val Arg Ser
65 70 75 80

GAG GAC ACA CCC ACT TAT TAC TCT ACT ACA GAG CTA CAA CCG ACT TAC
Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Thr Arg Glu Val Gln Arg Ser Tyr
85 90 95

TCC GCG CAA
Trp Gly Gln

(2) 配列 I D 番号 10 の情報

(i) 配列の特徴

(A) 長さ: 99 アミノ酸

(B) 型: アミノ酸

(D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 分子の種類: タンパク

(xi) 配列の記載: 配列 I D 番号 10

(2) 配列 I D 番号 12 の情報

(i) 配列の特徴

(A) 長さ: 5 アミノ酸

(B) 型: アミノ酸

(D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 分子の種類: タンパク

(xi) 配列の記載: 配列 I D 番号 12

Asp Tyr Trp Met Ser
1 3

(2) 配列 I D 番号 13 の情報

(i) 配列の特徴

(A) 長さ: 51 塩基対

(B) 型: 核酸

(C) 鎖の数: 二本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 分子の種類: cDNA

(ix) 特徴

(A) 特徴を表す記号: CDS

(B) 位置: 1...51

(xi) 配列の記載: 配列 I D 番号 13

GAT ATT AAA TAT GAT CCG ACT TAC ACA AAT TAT CCA CCA TCC CTA AAG
Asp Ile Lys Tyr Arg Gly Ser Tyr Thr Asn Tyr Ala Pro Ser Leu Lys
1 3 10 13

AAT
Asn

48

96

144

192

240

288

297

Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser Leu Lys Leu Ser Cys Val Ala
1 3 10 13

Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Thr
20 25 30

Pro Gly Lys Thr Met Glu Trp Ile Gly Asp Ile Lys Tyr Asp Gly Ser
35 40 45

Tyr Thr Asn Tyr Ala Pro Ser Leu Lys Asn Arg Phe Thr Ile Ser Arg
50 55 60

Asp Asn Ala Lys Ser Thr Leu Tyr Leu Gln Met Ser Asn Val Arg Ser
65 70 75 80

Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Thr Arg Glu Val Gln Arg Ser Tyr
85 90 95

Trp Gly Gln

(2) 配列 I D 番号 11 の情報

(i) 配列の特徴

(A) 長さ: 15 塩基対

(B) 型: 核酸

(C) 鎖の数: 二本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 分子の種類: cDNA

(ix) 特徴

(A) 特徴を表す記号: CDS

(B) 位置: 1...15

(xi) 配列の記載: 配列 I D 番号 11

GAC TAC TCC ATC ACC
Asp Tyr Trp Met Ser
1 3

11

(2) 配列 I D 番号 14 の情報

(i) 配列の特徴

(A) 長さ: 17 アミノ酸

(B) 型: アミノ酸

(D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 分子の種類: タンパク

(xi) 配列の記載: 配列 I D 番号 14

Asp Ile Lys Tyr Asp Gly Ser Tyr Thr Asn Tyr Ala Pro Ser Leu Lys
1 3 10 15

Asn

(2) 配列 I D 番号 15 の情報

(i) 配列の特徴

(A) 長さ: 18 塩基対

(B) 型: 核酸

(C) 鎖の数: 二本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 分子の種類: cDNA

(ix) 特徴

(A) 特徴を表す記号: CDS

(B) 位置: 1...18

(xi) 配列の記載: 配列 I D 番号 15

GAG CTA CAA CCG ACT TAC
Glu Val Gln Arg Ser Tyr
1 3

18

(2) 配列ID番号16の情報

(i) 配列の特徴

- (A) 長さ: 6 アミノ酸
- (B) 型: アミノ酸
- (C) トポロジー: 直鎖状

(ii) 分子の種類: タンパク

(iii) 配列の記載: 配列ID番号16

Glu Val Cln Arg Ser Tyr
1 5

(2) 配列ID番号17の情報

(i) 配列の特徴

- (A) 長さ: 30塩基対
- (B) 型: 核酸
- (C) 鎖の数: 一本鎖
- (D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 分子の種類: cDNA

(iii) ハイボセティカル配列: N0

(iv) アンチセンス: N0

(v) 配列の記載: 配列ID番号17

CATCAAGCTT CTCTACAGTT ACTGACGACA

30

(2) 配列ID番号20の情報

(i) 配列の特徴

- (A) 長さ: 36塩基対
- (B) 型: 核酸
- (C) 鎖の数: 一本鎖
- (D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 分子の種類: cDNA

(iii) ハイボセティカル配列: N0

(iv) アンチセンス: YES

(v) 配列の記載: 配列ID番号20

AGAAAATCTG TTGGAACCC CATAGATAG CAGCTG

36

(2) 配列ID番号21の情報

(i) 配列の特徴

- (A) 長さ: 36塩基対
- (B) 型: 核酸
- (C) 鎖の数: 一本鎖
- (D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 分子の種類: cDNA

(iii) ハイボセティカル配列: N0

(iv) アンチセンス: N0

(v) 配列の記載: 配列ID番号21

CCGCTTTCGA ACAGATTTC TCGCTCCCT GACACC

36

(2) 配列ID番号18の情報

(i) 配列の特徴

- (A) 長さ: 41塩基対
- (B) 型: 核酸
- (C) 鎖の数: 一本鎖
- (D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 分子の種類: cDNA

(iii) ハイボセティカル配列: N0

(iv) アンチセンス: YES

(v) 配列の記載: 配列ID番号18

CCATTACTGT GTACCAAGCT CTGACTTGAC GCACACAGA TGGAGCC

47

(2) 配列ID番号19の情報

(i) 配列の特徴

- (A) 長さ: 47塩基対
- (B) 型: 核酸
- (C) 鎖の数: 一本鎖
- (D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 分子の種類: cDNA

(iii) ハイボセティカル配列: N0

(iv) アンチセンス: N0

(v) 配列の記載: 配列ID番号19

TGGTACACAG TAATCGAAG ACCTACTTGC ATTGCTACCT GCAGAAG

47

(2) 配列ID番号22の情報

(i) 配列の特徴

- (A) 長さ: 42塩基対
- (B) 型: 核酸
- (C) 鎖の数: 一本鎖
- (D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 分子の種類: cDNA

(iii) ハイボセティカル配列: N0

(iv) アンチセンス: YES

(v) 配列の記載: 配列ID番号22

CGCTACCGA AAATCTGAC TTGTACCA GTAATACG CC

42

(2) 配列ID番号23の情報

(i) 配列の特徴

- (A) 長さ: 42塩基対
- (B) 型: 核酸
- (C) 鎖の数: 一本鎖
- (D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 分子の種類: cDNA

(iii) ハイボセティカル配列: N0

(iv) アンチセンス: N0

(v) 配列の記載: 配列ID番号23

TTACAAAGTA CACATTITTC GTACAGTTTC GGGGAGGGA CC

42

(2) 配列 I D 番号 24 の情報

(i) 配列の特徴

- (A) 長さ: 30塩基対
- (B) 型: 核酸
- (C) 鎖の数: 一本鎖
- (D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 分子の種類: cDNA

(iii) ハイボセティカル配列: N0

(iv) アンチセンス: YES

(v) 配列の記載: 配列 I D 番号 24

GATCAAGCTT CTAACTCTT CCGCTCTGA

(2) 配列 I D 番号 26 の情報

(i) 配列の特徴

- (A) 長さ: 30塩基対
- (B) 型: 核酸
- (C) 鎖の数: 一本鎖
- (D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 分子の種類: cDNA

(iii) ハイボセティカル配列: N0

(iv) アンチセンス: YES

(v) 配列の記載: 配列 I D 番号 26

30 CCTCATCTAG TAGTCACTGA AGATGAATCC

30

(2) 配列 I D 番号 25 の情報

(i) 配列の特徴

- (A) 長さ: 31塩基対
- (B) 型: 核酸
- (C) 鎖の数: 一本鎖
- (D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 分子の種類: cDNA

(iii) ハイボセティカル配列: N0

(iv) アンチセンス: N0

(v) 配列の記載: 配列 I D 番号 25

TGGCATCGAT CAAGCTTTAC AGTTACTGAC C

(2) 配列 I D 番号 27 の情報

(i) 配列の特徴

- (A) 長さ: 30塩基対
- (B) 型: 核酸
- (C) 鎖の数: 一本鎖
- (D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 分子の種類: cDNA

(iii) ハイボセティカル配列: N0

(iv) アンチセンス: N0

(v) 配列の記載: 配列 I D 番号 27

31 GACTACTGGA TGACCTCGGT CCGCAGGCT

30

(2) 配列 I D 番号 28 の情報

(i) 配列の特徴

- (A) 長さ: 40塩基対
- (B) 型: 核酸
- (C) 鎖の数: 一本鎖
- (D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 分子の種類: cDNA

(iii) ハイボセティカル配列: N0

(iv) アンチセンス: N0

(v) 配列の記載: 配列 I D 番号 28

TTAGTTTGTG TAACTGCGAT CATATTTAAT ATCTGGCACC CACTCTAG

(2) 配列 I D 番号 30 の情報

(i) 配列の特徴

- (A) 長さ: 33塩基対
- (B) 型: 核酸
- (C) 鎖の数: 一本鎖
- (D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 分子の種類: cDNA

(iii) ハイボセティカル配列: N0

(iv) アンチセンス: YES

(v) 配列の記載: 配列 I D 番号 30

40 GTAACTCGGT TGTACCTCTC TTGCAGAGAA ATA

31

(2) 配列 I D 番号 29 の情報

(i) 配列の特徴

- (A) 長さ: 51塩基対
- (B) 型: 核酸
- (C) 鎖の数: 一本鎖
- (D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 分子の種類: cDNA

(iii) ハイボセティカル配列: N0

(iv) アンチセンス: YES

(v) 配列の記載: 配列 I D 番号 29

GGCAGTACA CAAATATGC ACCATCCCTA AACAATCCAT TCACTATCTC C

31

(2) 配列 I D 番号 31 の情報

(i) 配列の特徴

- (A) 長さ: 41塩基対
- (B) 型: 核酸
- (C) 鎖の数: 一本鎖
- (D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 分子の種類: cDNA

(iii) ハイボセティカル配列: N0

(iv) アンチセンス: N0

(v) 配列の記載: 配列 I D 番号 31

CAGCTACAC CCAATTACTG CCGCAAGCC TCACTACTCA CAGTCTCC

40

(2) 配列ID番号32の情報

(i) 配列の特徴

- (A) 長さ: 36塩基対
(B) 型: 核酸
(C) 数の数: 一本鎖
(D) トポロジー: 直線状
(E) 分子の種類: cDNA
(F) ハイボセティカル配列: #0
(G) アンチセンス: YES
(H) 配列の記載: 配列ID番号32

TAGAGTCCTG ACCGAATTCG CACACCECGG AAGCTG

(2) 配列 I D 番号 34 の情報

(i) 配列の特徴

- (A) 長さ: 33塩基対
- (B) 型 : 核酸
- (C) 鎖の数: 一本鎖
- (D) トポロジー: 直鎖状
- (II) 分子の種類: cDNA
- (III) ハイボセチカル配列: NO
- (IV) アンチセンス: YES
- (V) 配列の記載: 配列 I D 番号 34

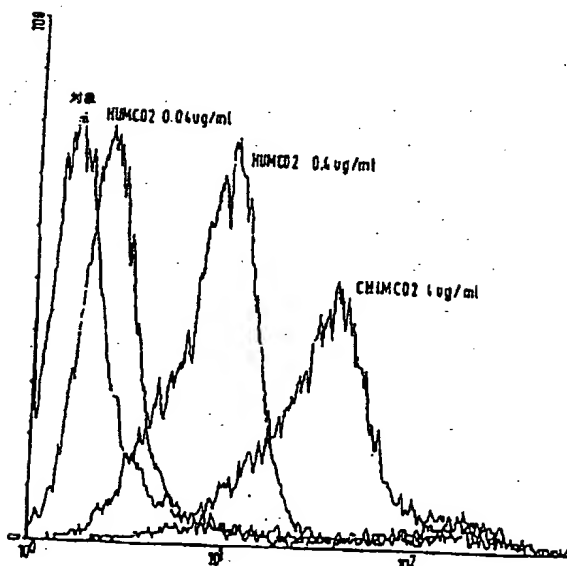
AAGCTCCGT CGAATTCATT TACCCGACA CAC

(2) 配列 I D 番号 33 の情報

(1) 配列の特徴

- (A) 長さ: 48塩基対
(B) 型 : 核糖
(C) 鎖の数: 一本鎖
(D) トポロジー: 直鎖状
- (11) 分子の種類: c DNA
(111) ハイボセティカル配列: 80
(1iv) アンチセンス: 80
(1v) 配列の記載: 配列ID番号33
- CGTCTCTT TTAAGCTTT CGGTCAAGC TCACTAGTA CAGTCTCT

GGTGGTGGT TTAAGCTTTC GGGTCAAGCC TCACTACTCA CAGCTGTC



【圖 1】

國際調查報告

PCT/GB 92/01251

[illegible]

IN DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		CONTINUOUS PAST TENSE INDEXING SHEETS
Category 1	Category 2	Category 3
	<p>WO-A-8 889 344 (CREATIVE BIOMOLECULES, INC.) [December 1988]</p> <p>JOURNAL OF MOLECULAR BIOLOGY vol. 196, no. 4, 1987, ACADEMIC PRESS pages 901 - 917 Chothia, C.; Lesk, A.M.; 'Canonical structures of the hypervariable regions of immunoglobulins.'</p>	

This report lists the patent family members relating to the patent document cited in the above-mentioned international search report. The members are so classified in the European Patent Office (EPO) file as the European Patent Office is not yet able to draw conclusions about the validity of the patent rights. 04/02/92

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO-A-9103968	11-07-91	AU-A- 6974091	24-07-91
		AU-A- 7032091	24-07-91
		AU-A- 7048691	24-07-91
		EP-A- 0460167	11-12-91
		EP-A- 0460171	11-12-91
		EP-A- 0460178	11-12-91
		WO-A- 9109966	11-07-91
		WO-A- 9109967	11-07-91
		GB-A- 2246781	12-02-92
		GB-A- 2246570	05-02-92
		JP-T- 4305398	24-09-92
		JP-T- 4504458	12-11-92
WO-A-9008187	26-07-90	None	
WO-A-9109967	11-07-91	AU-A- 6974091	24-07-91
		AU-A- 7032091	24-07-91
		AU-A- 7048691	24-07-91
		EP-A- 0460167	11-12-91
		EP-A- 0460171	11-12-91
		EP-A- 0460178	11-12-91
		WO-A- 9109966	11-07-91
		WO-A- 9109968	11-07-91
		GB-A- 2246781	12-02-92
		GB-A- 2246570	05-02-92
		JP-T- 4305398	24-09-92
		JP-T- 4504458	12-11-92
WO-A-8808346	01-12-88	AU-B- 612370	13-07-91
		AU-A- 1804888	21-12-88
		AU-A- 8679991	13-02-92
		EP-A- 0218554	07-08-89
		JP-T- 5240128	06-08-90
		US-A- 5112405	21-07-92
		US-A- 5091613	25-02-92

For more details about this report and Official Journal of the European Patent Office, No. 12/91

フロントページの続き

(51) Int. Cl.⁴ 識別記号 庁内整理番号
 C 1 2 N 5/10
 15/09 ZNA
 //(C 1 2 P 21/08
 C 1 2 R 1:91)

- (71) 出願人 ウォルシュ、ルイス
 イギリス国、シービー・２・１キュービー、
 ケンブリッジ、テニス・コート・ロード
 (番地無し)、イムノロジー・ディビジョ
 ン、デパートメント・オブ・パソロジー、
 ケンブリッジ・ユニバーシティー
- (72) 発明者 ワルドマン、ハーマン
 イギリス国、シービー・２・１キュービー、
 ケンブリッジ、テニス・コート・ロード
 (番地無し)、イムノロジー・ディビジョ
 ン、デパートメント・オブ・パソロジー、
 ケンブリッジ・ユニバーシティー

- (72) 発明者 ウォルシュ、ルイス
 イギリス国、シービー・２・１キュービー、
 ケンブリッジ、テニス・コート・ロード
 (番地無し)、イムノロジー・ディビジョ
 ン、デパートメント・オブ・パソロジー、
 ケンブリッジ・ユニバーシティー
- (72) 発明者 クローエ、ジェームズ・スコット
 イギリス国、ビーアール・３・３ビーエス、
 ケント、ベッケンハム、ラングレイ・コー
 ト (番地無し)、ウエルカム・リサーチ・
 ラボラトリーズ
- (72) 発明者 ルイス、アラン・ピーター
 イギリス国、ビーアール・３・３ビーエス、
 ケント、ベッケンハム、ラングレイ・コー
 ト (番地無し)、ウエルカム・リサーチ・
 ラボラトリーズ